

尿中の蛋白質の定量の検討

第 2 報

尿中の微量蛋白質の採尿後即時定量法について

岡山大学医学部公衆衛生 (指導: 緒方正名教授)

田 中 由 紀 子

(昭和57年6月1日受稿)

Key words: 尿蛋白, 裸眼比色
coomasie brilliant blue
トネイン-TP

緒 言

前報¹⁾で筆者は尿中の総蛋白質を正確に測定する方法として、まづ尿を Sephadex G-50fine を用いてゲル濾過後、Bio-rad 試薬を用いた吸光度測定法について報告した。しかし、この方法はあくまでも研究室に於いて正確な測定値を得る事を目的としたものであった。

現在まで、野外または現場で採尿後ただちに測定する方法としては、テストテープが広く用いられて来た。本報ではテストテープと同様に簡便に利用され、尿蛋白の変質を心配する必要もなく、正確な測定値又は近似が得られ、なお、テストテープの痕跡以下の測定が可能な二つの方法について報告する。

一方、労働現場やスポーツ現場では、健康管理の一つの方法として、肉体負担をかける直前、又は、直後に尿中の総蛋白質を測定する方法がある。即ち、まず作業前の蓄積疲労の多い人を、又、作業後の肉体負担度の高い人を見出す事である。その為には可能な限り迅速簡便に、尿中の微量蛋白質を測定する事が要求される。しかし、現在では、採尿後測定するまでの時間について、テストテープを利用する以外の場合、測定機器のある場所への尿試料の運搬やサンプリングの為に可成りの時間を必要とする。又、その為には採取した試料に沈澱が生じたり、尿蛋

白の変質を防ぐ努力が必要である²⁻⁵⁾。また、測定機器を必要としないテストテープや濾紙スポット法等^{6,7)}は、微量蛋白質の測定には感度が良好であるとは言えない。

すなわち本実験では、Bio-rad 試薬と同じく Coomascie Brilliant Blue を配合し、体液中の共存物質の影響も少く、簡便迅速に高感度で蛋白質が定量可能なように開発された市販のトネイン-TP 試薬⁸⁾を用いた。そして現場に携帯用簡易型分光光度計を持参して、採尿後即時に定量する事を試みた。しかし、時間的な制約や測定手段の複雑さの為に、多くの試料がある場合にはなお改良の余地があると考えた。そこでこれらの問題を解決する方法として、吸光度測定をする代りに裸眼比色法を試みた。その結果、前述の吸光度測定よりはるかに簡便迅速で、直接濃度一定の標準液の呈色度と比較をするので、吸光度の測定に比して、離散量であり正確さはやや劣るが、蛋白質濃度が直接得られ、吸光度測定の場合とは良好な回帰関係を示す。したがって現場での実用 (Screening) には本法が便利である。

本研究の為の尿試料は、男子高校生の夏期合宿訓練に参加したバスケット部員と柔道部員の運動前後尿を、採取して用いた。また、事業所の従業員の、定期検診現場で採尿後、ただちに定量を行ない、裸眼比色法の再確認とした。

なお、比較の目的で、前述の高校生の運動前後尿を用いて、一次元免疫拡散法によるアルブミンの定量を行なった。

以上、本研究は、スポーツ又は作業現場で採尿後、即時に尿中の微量蛋白を測定する事の可能性を検討し、また、スポーツ従事者の肉体的負担度を推定した。こゝにその成績を報告する。

実験材料及び実験方法

A. 実験材料

1) スポーツ従事者の肉体的負担度の測定

1981年8月1日午後2時より4日午前11時までの3泊4日の合宿訓練に参加した15才から17才までの男子高校生のバスケット部員19名と柔道部員13名について、1日2回採尿した。すなわち、初日は午後2時30分と午後5時に、最終日は午前9時と午前11時30分に、中の2日目と3日目は午前9時30分と午後5時に採取し即時測定した。たゞし午前の採尿以前には、起床後たゞちに約30分の駆け足をしている。また、これら高校生の中には途中で尿を提供しなかった者もあった。それで期間中を通しての検討が必要な場合には、これら尿試料を全期間中完全に提供しなかった者のデータは省いた。

2) 事業所での裸眼比色法の検討

某事業所の定期検診に立ち合い、男子25才より70才までの職員30名に女子職員1名を加えた者の尿について呈色した標準試薬を対照として測定を行なった。

B. 試薬溶液

1) トネイン-TP試薬溶液：大塚アッセイ研究所製の試薬溶液をそのまま用いた。

2) 標準物質：人血清アルブミン（トネイン-TP試薬キットとして添付された凍結乾燥品4mg/vial）を用いて、生理的食塩水で溶解し必要な濃度に希釈後使用した。

3) 生理的食塩水：和光純薬試薬特級の食塩を用いて調製した。

4) 改良一次元免疫拡散法：

a：寒天はDifco-Laboratory U.S.A.のSpecial Agar Nobleを使用した。

b：抗体（Anti-Human-Albumin-Serum）はMiles Laboratory U.S.A.の製品を使用した。

c：0.02Mリン酸緩衝液は0.02Mの第一リン酸ナトリウムと第二リン酸ナトリウムの液を4：6の割合で混合し、pHを7とした液に食塩を加えて0.85%とした。これらはいづれも、和光純薬試薬特級品を用いて調製した。

d. 1%タンニン酸液は、半井薬品の試薬特級のタンニン酸を用いて調製した。

C. 分光光度計：

a：携帯用分光光度計（MODEL SP-1）、柴田化学製を使用した。

b：日立製（MODEL 200-10型）分光光度計を用いた。

3) ミクロピペット

a：50～200 μ l用Finn Pipette
b：1000～5000 μ l用Finn Pipette } はFINN-

PIPETTE KY製を用いた。

c：25 μ l用（Drammond Dialomatic Micro dispenser）ドラモンド社製を用いた。

4) 抗体一次元免疫拡散板⁹⁾：

寒天末をpH7のリン酸緩衝液に、2%の割合で溶解し、50°Cに保ちつゝ、抗体を60 μ l/6.5mlの割合で加え、よく攪拌後円型のプラスチック容器に厚さ3mmになるように流し込み、4°Cで1時間放置したものを用いた。

D. 実験方法

1) 尿中の微量蛋白質の定量

a：分光光度計による測定法：トネイン-TP試薬⁸⁾を3mlずつ試験管に分注し、それに尿試料50 μ lを加え、よく攪拌して10分後に分光光度計で波長595nmの吸光度を測定した。この時生理的食塩水50 μ lをトネイン-TP試薬3mlに加えたものを対照液とした。

一方、標準蛋白質溶液100mg/dlを人血清アルブミンを用いて調製し、生理的食塩水で倍数希釈し、上記の検体と同様に測定し、検量線を作製した。この検量線より算出して尿試料の蛋白質量を求めた。

b. 裸眼比色定量法：上記分光光度計による測定に用いた試料液（トネイン-TP試薬で呈色した液）と、同じく標準液が呈色した液を標準発色液とし、両者の呈色度を比較して、最も近似の標準発色液のアルブミン濃度を以て、試料尿中の蛋白質量とした。

Table 1-a Total protein in urine before or after exercise. (mg/dl)

※1	8/1	PM2:00	PM5:00	8/2	AM9:30	PM5:00	8/3	AM9:30	AM5:00	8/4	AM9:00	AM11:00
B-1		7.1 (6.55)	44. (31.06)	48. (26.79)	20. (12.63)		12.3 (8.95)	18.8 (14.1)		41. (28.11)	39. (26.74)	
B-2		7.2 (4.87)	62. (39.16)	15. (12.)	28.2 (17.81)		6.3 (6.87)	11. (13.2)		13. (10.06)	39. (44.57)	
B-3		65. (45.88)	63. (43.2)	40. (27.43)	60. (37.89)		22.3 (15.74)	52. (36.71)		31.5 (18.44)	31. (23.25)	
B-4		34 (25.5)	27.5 (17.84)	32. (19.89)	69. (41.4)		30. (17.14)	67. (37.4)		51.5 (35.61)	42. (25.2)	
B-5		12.5 (9.38)	42. (24.59)	11.5 (7.46)	22. (13.54)		12. (7.78)	20. (12.31)		11. (8.8)	75.5 (53.29)	
B-6		7.2 (7.2)	84.5 (65.42)	5.5 (5.75)	44.2 (33.15)		16. (12.8)	48. (36.6)		18.2 (20.8)	115. (69.)	
B-7		11. (8.25)	27. (18.)	8.5 (6.38)	22.2 (15.22)		8. (5.49)	29. (24.86)		12. (15.27)	33. (23.29)	
B-8		8.3 (7.97)	43.5 (30.71)	12.5 (7.89)	37.3 (21.31)		18. (10.8)	26. (17.33)		21. (15.27)	33. (23.29)	
B-9		8. (9.14)	35.5 (27.48)	11. (8.25)	24.5 (19.6)		16. (13.24)	60. (45.)		14. (12.)	19.5 (16.71)	
B-10		8.2 (9.37)	70. (48.)	9.8 (8.11)	23. (17.09)		18. (13.94)	12.5 (12.5)		24. (16.94)	37. (24.67)	
B-11		18.5 (14.32)	66. (48.)	27. (18.)	30. (18.46)		16.2 (10.8)	8. (4.57)		23. (15.33)	37. (24.67)	
B-12		7. (9.88)	25. (22.22)	15.5 (9.07)	48. (26.79)		17. (11.33)	26.5 (17.67)		15.5 (13.29)	62. (40.54)	
MEAN		16.17 (13.2)	49.17 (34.64)	19.69 (13.07)	35.74 (22.91)		16.01 (11.24)	31.57 (22.64)		22.98 (16.97)	51.19 (37.06)	
S.D.		17.24 (11.59)	17.46 (14.44)	13.74 (7.89)	16.25 (9.69)		6.27 (3.55)	20.12 (12.97)		12.57 (7.95)	27.49 (18.70)	
t		4.58 ※		3.13 ※			3.20 ※			2.85 ※		

B; The member of Basket team.

※1; Date and Time of the measurement.

(); Corrected value to a urine density of 1.024

Table 1-b Total protein in urine before or after exercise. (mg/dl)

※1	8/1	PM2:00	PM5:00	8/2	AM9:30	PM5:00	8/3	AM9:30	PM5:00	8/4	AM9:00	AM11:00
J-1		8.5 (9.71)	29.5 (22.84)	8.1 (6.94)	75. (52.94)		11. (7.54)	39.5 (29.63)		12.8 (10.24)	32. (28.44)	
J-2		17. (19.43)	119. (81.6)	19.5 (12.32)	70. (39.07)		22. (13.2)	58. (33.95)		12.5 (13.04)	20. (16.)	
J-3		37. (28.65)	69. (49.45)	26.5 (19.27)	49.5 (33.94)		21.5 (14.33)	105. (72.)		19.5 (15.1)	89. (16.)	
J-4		24.5 (18.38)	40. (24.63)	19. (13.03)	34. (24.11)		14. (10.5)	94. (70.5)		25. (18.18)	60. (41.14)	
J-5		14.5 (12.89)	113. (69.54)	20. (12.31)	54. (35.03)		17.5 (11.35)	45.5 (30.33)		20.1 (14.19)	30. (25.71)	
J-6		23. (18.4)	160. (139.35)	26.8 (16.93)	38. (23.38)		27. (15.43)	85.5 (51.3)		24. (14.4)	22. (14.27)	
MEAN		26.75 (17.91)	88.25 (64.57)	19.98 (13.47)	53.45 (34.75)		18.83 (12.06)	71.25 (47.95)		18.98 (14.19)	42.17 (32.05)	
S.D.		9.86 (6.49)	50.79 (43.54)	6.80 (4.27)	16.51 (10.88)		5.84 (2.87)	27.23 (19.70)		5.35 (2.99)	27.06 (19.56)	
t		3.22 ※		3.78 ※			5.02 ※			2.19		

J; The member of judo team.

※1; Date and Time of the measurement.

(); Corrected value to a urine density of 1.024

2) アルブミンの定量 (SRID[®]による測定法): 抗アルブミン抗体を含む拡散板に 3 mm の直径の穴をあけ, その中へ試料尿 5 μ l を, マイクロディスペンサーを用いて注入し, 蓋をして水平を保ちつゝ、室温で一昼夜放置した。約 24 時間後に生理的食塩水でよく洗滌し, タンニン酸液中に約 10 分間浸し, とり出して流水で余分のタンニン酸を洗い流した。一方, 標準液について倍

数稀釈したものを, 同じプレートに加えて出来た沈降輪の直径をはかり, これによって検量線を作った。この検量線により, 試料尿の示した沈降輪の直径から, 試料尿のアルブミン量を決定した。

実験結果

A . 高校生の合宿訓練期間中の尿中の蛋白質

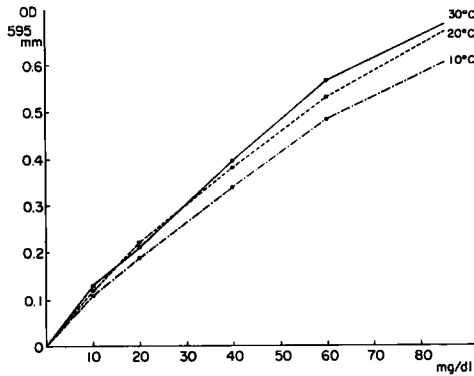


Fig. 1 Calibration curve of minut of protein (H.S.A.) at the three types of temperatur.

Table 2 The comparison of the quantume with total protein and albumin in urine on before and after exercise.

	1) before		2) After		3) After-Before	
	X	Y	X	Y	X	Y
1	8.5	5.0	29.5	27.5	21.0	22.5
2	17.0	10.0	119.0	54.0	102.0	44.0
3	37.0	29.0	68.0	53.5	31.0	24.5
4	28.3	16.0	77.3	58.0	49.0	42.0
5	24.5	10.0	40.0	40.0	15.5	30.0
6	14.8	8.0	83.0	39.0	69.0	31.0
7	14.5	9.2	113.0	57.0	98.5	47.8
8	12.8	5.6	32.0	16.0	19.2	10.4
9	12.5	8.4	20.0	12.0	7.5	3.6
10	19.5	7.5	89.0	36.5	69.5	29.0
11	23.0	13.0	72.0	54.0	49.0	41.0
12	25.0	8.0	60.0	44.5	35.0	36.5
13	21.0	5.0	150.0	54.0	129.0	49.0
14	20.1	18.0	30.0	20.0	9.9	2.0
15	15.0	6.0	42.2	28.5	27.2	22.5
16	24.0	22.0	22.0	22.0	-2.0	0.0
17	41.0	29.0	39.0	26.0	2.0	-3.0
18	17.0	11.5	76.1	66.0	59.1	54.5
19	13.0	5.5	39.1	26.0	26.9	20.5
20	31.5	29.0	31.0	21.0	-0.5	-8.0
21	51.5	12.0	42.0	21.5	-9.5	9.5
22	18.2	8.0	83.3	60.0	65.1	52.0
23	19.0	8.4	24.0	18.0	5.0	9.6
24	21.0	9.0	33.0	23.5	12.0	14.5
25	14.0	9.5	19.5	13.0	5.5	3.5
26	7.5	6.5	33.5	25.0	26.0	18.5
27	24.0	16.5	38.0	32.0	14.0	15.5
28	23.0	13.0	37.0	30.0	14.0	17.0
M	21.4	12.1	55.1	34.9	33.9	22.9
a	0.666		0.812		0.843	

t=6.75**

- 1) $y = 0.495x + 1.511$
 - 2) $y = 0.394x + 13.241$
 - 3) $y = 0.420x + 9.135$
- x: total protein in urine
y: albumin in urine

の測定

1) トネイン-TP法による尿中総蛋白質の定量
訓練期間中を通じて完全に尿を提供した者(バスケット部員12名, 柔道部員6名)の肉体疲労度を観測する目的で, 運動負荷前後の尿中蛋白質量を測定した。トネイン-TP法による測定結果 Table 1 に示す。〔表中の B 及び J はバス

ケット部及び柔道部を示す。〕各々の測定日の左側が運動負荷前の測定値, 右側が運動負荷後の測定値である。また () の中はそれらの値を比重補正したもので, 比重補正式は以下に示す。

$$\text{尿比重1.024補正值} = \frac{\text{蛋白質濃度} \times (1.024 - 1.000)}{(\text{尿比重} - 1.000)}$$

なお, 柔道部員の4日目のデータを除き, 5%の危険率で, 運動後の蛋白質量は運動前の蛋白質量より有意に増加している事に対応のある検定法により確認をした。

2) トネイン-TP法における発色時の温度による影響について: 乾丸⁸⁾によって人血清については詳細な検討がなされているが, 本実験では人血清アルブミンを標準として用い, 前述の蛋白質量は測定の都度アルブミン標準液による検量線から算出した。測定時は気温30°Cであった。しかし実用上からは気温の変化も考慮する必要があるため10°C, 20°C, 30°Cにおける検量線を同時に作製した。Fig. 1 にその結果を示す。この図からも明らかであるが, 同時期では温度が低い程発色はやゝ低い事が認められる。しかし, 試料を測定する都度検量線も作製するので, 測定には支障はない。一方, 何れの温度においてもトネイン-TP試薬による測定では検量線は直線よりやゝずれる傾向にあるので, 回帰直線から蛋白質量を算出する事が出来ない。したがって必ず検量線からの計算が必要である。

3. 運動負荷前後の尿中のアルブミン量: 尿蛋白質中のアルブミンは運動負荷によって増量する事は周知の事である¹⁰⁻¹²⁾。しかし, 前後の差異を確認する目的で, 前の排尿時から採尿時までの時間が正確に判っている検体について, 抗体一次元免疫拡散法によるアルブミンの定量を行なった。その結果を Table 2 に示す。その結果は, 対応のある検定で1%の危険率で肉体負荷前後のアルブミンの増加は有意であった。

Table 2 から明らかであるが, 28試料中2試料は減量していたが, 総蛋白質量についても, 負荷前の方が多量のものがある。この現象には種々の原因が考えられるが, 運動中の各人の運動量を正確にはかる術もないので, 結論は出せない。

Table 3 The comparison of the total protein in urine between by the colorimetry by naked eyes (x) and by the spectrophotometry (y). (mg/dl)

X	Y
12.50	12.30
45.00	42.00
6.25	6.30
25.00	22.30
25.00	30.00
12.50	12.00
13.00	16.00
7.00	8.00
8.00	8.00
12.50	18.00
7.00	8.00
12.50	16.00
12.50	18.00
12.50	16.20
6.25	8.70
8.00	11.00
25.00	22.00
20.00	21.50
30.00	33.00
12.50	14.00
12.50	17.50
25.00	25.00
25.00	27.00
20.00	19.50
20.00	13.00

$y = 0.886x + 3.082$
correlation coefficient: 0.946

B. 裸眼比色測定法

1) 予備実験としてのスポーツ現場に於ける裸眼比色測定法：前述の高校生のスポーツ現場に於て、採尿直後の尿25検体について、トネイン-TP 試薬に加えられ、発色した液と、既知の濃度の蛋白標準液のトネイン-TP試薬により発色した液との発色状態を比較して、裸眼による比色測定を行なった。又此の裸眼比色測定による結果をxとし、同液による吸光度測定結果をyとして、Table 3 に比較して示した。標準液は300mg/dl及び100mg/dlを用意し、現場で100mg/dlを倍数稀釈し、6.5mg/dlまでを作り、試薬に加えて発色させた。

更に、詳細な検討と確認をする目的で、別に42検体について比較測定を行なった。この場合

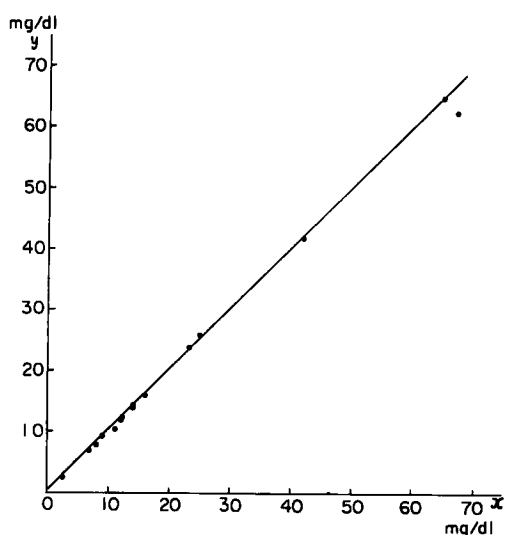


Fig. 2 Regression curve of total protein in urine which were measured after 10 minutes (x) and after 120 minutes. (y)
 $y = 0.961x + 0.593$

は標準液濃度を100mg/dl, 80mg/dl, 60mg/dl, 40mg/dl, 20mg/dl, 10mg/dl, 5mg/dl及び50mg/dlと25mg/dl, 7.5mg/dlとし、裸眼比色の場合の対照液を作った。なお、引き続き、この裸眼比色を行なった液をそのまま、用いて吸光度測定を行なった。此の場合の裸眼による比色測定結果と吸光度による測定結果の相関関係は前者の0.946より更に良好で0.958となり、回帰係数は同様に $y = 0.886x + 3.082$ から $y = 1.016x - 0.057$ と好転した。

なお、此の際の裸眼比色値は非連続量であるが、便宜上仮に連続量とし回帰及び相関関係を検討した。

2) 試薬に尿試料を加えてからの時間的な検討：トネイン-TP試薬は呈色の安定性が良く、任意の時間に測定可能であり、試薬に試料を加えて約5分後から数時間後の任意の時間に測定する事が出来ると報告されている⁸⁾。本実験では17試料尿について検討を行なった。すなわち、トネイン-TP試薬に尿試料を加えて発色させ、同じ液で10分後及び2時間後に吸光度測定を行なった。10分後の測定結果をx軸上に、2時間後に測定した結果をy軸上に示した。おのおの10分後及び2時間後に同じ標準液による呈色液の吸

Table 4 The comparison of total protein in urine between by the colorimetry by naked eyes (x) and by the spectrophotometry (y) at certain factory (mg/dl)

	x	y ₁	y ₂	age	sex
1	5.5	2.1	5.1	65	m
2	2.5	3.2	1.9	47	m
3	2.5	1.2	1.9	28	m
4	5.0	3.8	4.6	45	m
5	5.0	6.6	4.6	39	m
6	10.0	8.5	10.0	28	m
7	5.0	4.6	4.6	38	m
8	2.5	0.0	1.9	70	m
9	10.0	9.2	10.0	30	m
10	2.5	1.4	1.9	34	m
11	30.0	30.1	31.5	49	m
12	5.0	4.2	4.6	59	m
13	20.0	23.7	20.7	61	m
14	5.0	3.5	4.9	45	m
15	7.5	7.2	7.3	38	m
16	2.5	0.0	1.9	45	m
17	2.5	1.6	1.9	30	m
18	15.0	14.4	15.4	39	m
19	5.0	6.2	4.9	45	m
20	15.0	19.3	15.4	44	m
21	10.0	6.3	10.0	45	m
22	2.5	2.8	1.9	41	m
23	10.0	11.3	10.0	44	m
24	2.5	4.6	1.9	35	m
25	2.5	2.8	1.9	41	m
26	10.0	6.4	10.0	55	m
27	15.0	12.5	15.4	32	m
28	20.0	24.4	20.7	47	m
29	2.5	5.2	1.9	44	f
30	2.5	3.8	1.9	67	m
31	12.5	11.9	12.7	41	m
m	8.0	7.8	7.8		

corr. coeff. 0.960

$y = 1.077x - 0.791$, y_2 ; converted value to (y_1) from (x)

光度から検量線を作製し、それぞれの検量線から蛋白質量を算出した。Fig. 2 からも明らかに両者の相関関係は良好であり(0.999), 又回帰係数は、 $y = 0.961x + 0.593$ と良好であった。

此の事実は、前述の裸眼比色法により現場でや、近似的に尿中の蛋白質量を測定し、必要に応じて責任者に報告した後、後述の如くそれらの液を研究室に持ち帰り、吸光度測定をする事が可能であると考えられる。

3) 某事業所における尿中総蛋白質量の裸眼比色法及び吸光度測定法による結果の比較検討: Table 4 は某事業所における定期検診に立ち合い、裸眼比色法による測定結果をxとし、これに用いた液(尿試料をトネイン-TP液に加えて

発色した液)を研究室に持ち帰って、日立モデル200-10型分光光度計で、約1時間後に測定した値をyとして比較したものである。この際、前述の結果から吸光度測定について、発色後2時間以内では変化がない事を確認してあるので、敢えて、2時間以内(此の場合は約1時間後)に、先の現場での裸眼比色結果とを比較した。測定に際しては、可能な限り温度を一定しておく事に留意した。裸眼比色結果は不連続量であるが、便宜上連続量と見做した。両者間の回帰関係は $y = 1.077x - 0.791$ となった。

ちなみに、裸眼比色の結果を上回帰直線により吸光度に換算して y_2 として示した。

5 mg/dl 以下の判定にはや、正確さに欠ける場合があるが、それ以上の濃度であれば、検量線を現場で作る必要もなく、検量線からの算出と云うわづらわしさも無しに、直接に蛋白濃度として判定が出来る。

考 案

すでに松井²⁾によって高校生の運動負荷前後の尿中の微量蛋白質の測定については詳細に検討し報告されている。しかし、本法は比濁法によるものであり、主に採取した尿を実験室まで持ち帰り測定した結果であった。今回は現場で採尿後たゞちに測定し、その結果が直ちに利用されスポーツの現場や労働現場で健康管理に役立たせたいと考え、この目的に対処出来る方法について検討した。その結果、即時の測定は、トネイン-TP試薬を用いる事により可能であり、実際に高校男子生徒の夏期合宿訓練に際して、測定結果をたゞちに報告し、異常な濃度の蛋白尿を見出した生徒には留意するよう、担当教官に注意を促がした。特に合宿初日の運動負荷以前にすでに116mg/dlと105mg/dlの高濃度の蛋白質量を示した者2名は、特別に訓練には差はつけなかったと云う事であるが、翌日には前日の負荷前よりも低い値に回復していた。なお、全期間を通じて300mg/dlと高濃度の蛋白尿が見られた者もあったが、全期間中に身体の異常を訴える者もなかったと云う事である。担当教官が注意して管理を行なったものと推定する。Table 1 に示したデータは、全期間を通じて完全に採

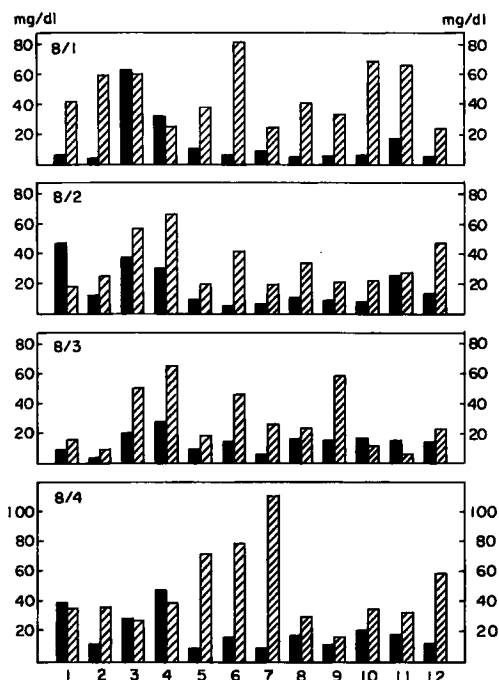


Fig. 3-a Comparison of total protein in urine before and after exercise on each person respectively, on basket team
 ■ : before exercise
 ▨ : after exercise

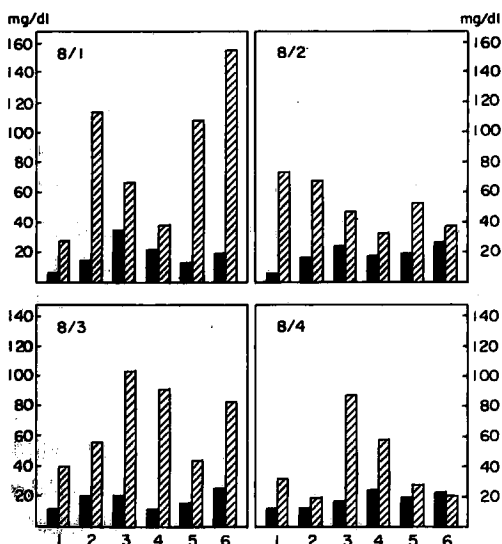


Fig. 3-b Comparison of total protein in urine before and after exercise on each person respectively, on judo team
 ■ : before exercise
 ▨ : after exercise

尿が出来、測定が可能であった者についてのみ記載した。

又、前尿排泄時間から、採尿時までの時間が確実に判明している者の尿にだけついて、運動負荷前後の尿中にアルブミン量の変動が認められるか否かを、抗体一次元単純拡散法により比較検討した。Table 2の1), 2), 3), の項のそれぞれ x は総蛋白質量を, y はアルブミン量を示している。

一方に於て, pootsman¹¹⁾や松井ら¹²⁾の論文にも報告されている通り, アルブミンだけでなくそれ以外の尿蛋白質としてトランスフェリンや, アシッド-グリコプロテイン等も増加すると考えられる事から, 個人差あるいは何等かの理由で, その他の蛋白質が存在する可能性がある。この事については更に詳細な検討が必要である。

Fig. 3 の棒グラフは運動前(黒柱)と運動後(斜線柱)の尿中の総蛋白質の量的な比較を各個人毎に示したものである。殆んど例から明らかに運動前よりも運動後に増量が認められる。しかし、運動前にすでに多量の蛋白質が初日から認められたバスケット部員 No.3と No.4 の生徒は前日よりの蓄積疲労が考えられる。又、二日以後、合宿訓練が終るまで、他の者に較べてや、高い値を示したが、その後生理学的に何等かの障害が起きたと言う報告は聞かれなかった。また、No.1 の生徒も2日目に高濃度の蛋白質量を認めた。上述の例と共にテストテープでは痕跡の範囲にあるので、病的とは言えないが、やはり担当教官に経過の観察を依頼した。しかし、合宿後も元気になっているとの報告を受けた。

また、バスケット部員に較べて柔道部員の方が、訓練がはげしい為か又は運動の種類によるのか、運動前後の総蛋白質量の増加が大きい。しかし、翌朝になると前日の肉体負荷前の値近くまで戻っており、特に蓄積疲労が残っている生徒はいないとの報告であった。

これ等の測定は携帯用の簡易型吸光度計を現場に持参して測定したが、測定手段がやはり複雑であり、迅速な測定結果が運動を行なう前や、運動終了後に要求される。一方、トネイン-TP法の最大吸収は595nmであり、可視光線で測定されるので、目測による標準液の呈色した

ものとの比較が可能であろうと考えた。実際、トネイン-TP試薬が試料尿と反応して呈した液の色と、標準液が任意に希釈された液について同じく呈色した液とを裸眼比色をして、近似の色を標準液よりえらび、その液の蛋白質濃度を試料尿の蛋白質濃度とした。更に、試験的にこれら裸眼比色に用いた液を研究室に持ち帰り、吸光度測定を行ない、それぞれの方法によって得られた結果を比較した。その結果は Table 3 に示す通り良好な回帰関係を示している。この場合、裸眼比色による測定結果は非連続量であるが、仮に便宜上連続であると見做したのは前述の通りである。

なお、実用に際しては、標準液の種類（濃度差による）を100mg/dlから80mg/dl, 60mg/dl, 40mg/dl, 20mg/dl, 10mg/dl, 7.5mg/dl 及び 5 mg/dl の8つ位用意すれば充分目的を果す事が可能である。又、この液によるトネイン-TP 試薬との反応呈色の程度を実際のサンプルの試薬との呈色度とを比較して、試料尿中の蛋白質量とするのである。更に、これらの液を実験室に持ち帰り、分光光度計で測定し、より正確なデータを得る事が可能である。

したがって、此の際問題になるのは、これ等の液について、時間的に呈色が安定か否かと言う事である。純粋な蛋白質として、アルブミン及びグロブリンについて、それらの発色後の安定性については乾ら⁸⁾が検討し、180分までは安定であると報告している。そこで、尿について検討した結果、試薬に試料尿を加えてから2時間後でも呈色は安定している事を確認した。

したがって、以上の事を総括して、現場で採尿後に即時試薬に標準液及び試料尿をそれぞれ加えて、よく攪拌しておけば、10分以後随時に裸眼比色法により、や、精度は劣るが、迅速に蛋白質濃度として各試料尿のデータが得られる。一方、それらの液を実験室に持ち帰り、分光光度計で吸光度測定をし、更に正確なデータを得る事が出来る。運搬の時に注意すべき事は、温度変化が出来るだけ無いようにする事である。筆者は発泡スチロールの箱に入れて恒温を保ち、常時持ち帰った。なお可能な限り早い時間に吸光度測定の方がより安心であろう。

なお、現場の測定は時期的には一年を通じて要求されるであろう故、測定時による発色の影響を検討する必要がある。乾ら⁸⁾は発色時の温度による影響を人血清について検討し、25°Cと比較して4°Cで10%の変動を示し、25°C±10°Cでは2%の変動であり、蛋白質測定に影響はないと報告している。筆者は人血清アルブミンを標準液とし、測定試料も血清成分に類似である尿蛋白である事から、問題はないと考えた。しかし、確認する為に、人血清アルブミンについて、10°C, 20°C及び30°Cで検討した。その結果、測定の都度標準液を作り、希釈して用いるので、測定誤差は殆んど生じないと考える。

前にも述べたが、吸光度測定ではまず標準液による検量線を作り、得られた試料尿の吸光度を、検量線から算出して試料尿中の蛋白質濃度を算出しなければならないが、裸眼比色測定の場合は、目測でたゞちに試料尿中の蛋白質濃度が得られるので実用的であると考ええる。但し、両者何れの場合も、5 mg/dl 以下は、や、不正確になる可能性は存在する。

Table 4 は上記の裸眼比色法による現場での測定結果と、同試料液を実験室に持ち帰って、吸光度測定した結果との比較をしたものである。以前と同じく、裸眼比色測定結果を連続と見なして得た回帰関係は1.077と良好であり、こゝで改めて裸眼比色法の有用性を確認した。

すでに労働衛生上、生理的な立場から労働負担度が重要視されている現在において、作業管理重点がおかれ、労働負荷の解析も必要である。その際受診者が納得するデータが可能な限り要求される時、たゞちに測定結果を示し得る本法は有効な手段であろう。

結 論

15才から17才までの男子高校生の夏期合宿訓練期間中の尿を試料として、トネイン-TP試薬を用い、携帯用簡易型分光光度計で吸光度測定を行なった。そして尿中の微量蛋白質を測定した。すなわち、採尿後これらの試料を即時試薬と反応させ、その液について吸光度測定を行なった。蛋白質量の多く認められた者については訓練中留意されるよう、測定結果と共に報告し

た。また、簡易法として上記の反応液を裸眼比色する方法を考案した。つづいて某事業所の定期検診の際、裸眼比色法で測定を行い、その実用性を検討した。それ等の成績は以下の通りである。

1) 携帯用分光光度計を用いて、採尿後現場でたぐちに各個人の尿中蛋白質量を、トネイン-TP法により測定した。特に蛋白濃度が高い生徒には留意するよう担当教官に報告した。期間中の生徒の健康状態に教官が注意の上、無事に合宿訓練を終えた。この結果、特別に注目すべき事態も起きず、一時高濃度の蛋白質が認められた者も日を追って低濃度に移行した。これは担当教官が或る程度訓練期間中に注意する事によって、蛋白質量から推定すれば、疲労は減少すると考えられる。又、テストテープよりも感度が高く5 mg/dl以上の濃度を確実に示す事が出来るので信頼度は高く、この事実は現場で高く評価された。

2) 訓練中の尿について、各個人の運動負荷前と負荷後に尿中に現われるアルブミン量の変動状態を、一次元抗体抗原反応により測定した。その結果を対応ある検定を行なった。即ち1%の危険率で肉体負荷後にはアルブミン量も、総

蛋白質量と平行して増量する事を確認した。

3) 即時に尿中の蛋白質濃度を測定する方法として、裸眼比色法を考案した。すなわち、人血清アルブミンを標準として、トネイン-TP試薬で標準呈色系列を作り、同様にして呈色した試料尿の呈色度を裸眼により、呈色液と対照比較して、最も近似の標準色液の濃度を以て、試料尿の蛋白質濃度とした。又、同じ液について、595nmで吸光度測定を行なって得た蛋白質濃度との比較では5 mg/dl以上で良好な回帰関係を示し、実用に充分有効であると考えた。

4) 裸眼比色測定法の実用例として、某事業所の定期検診に立ち合い31名の被検者からの尿を、採尿後即時に測定し、結果を報告した。将来、労働、管理が重要視される場合には従来の測定法に代って、簡便迅速で且つ正確な裸眼比色法がより一層実用的であると推定された。

謝 辞

本論文を作製するに当って、多大なるご指導、ご鞭撻を、また、ご校閲を賜わった恩師緒方正名教授に心より謝辞を申し上げます。

なお、試料を頂くに当ってご高配を頂いた方々や、試料を提供して下さい下さった方々にも深く感謝いたします。

文 献

1. 田中由紀子：尿中の蛋白質の定量の検討第1報 ゲル濾過を用いる尿中微量蛋白質の定量について、岡山医学会雑誌，93，861—871，1981.
2. 松井義典：Donaggio反応及び尿微量蛋白反応に関する研究 第4報 高校生運動負荷前後の比濁法による迅速尿中微量蛋白量につて、岡山医学会雑誌，93，615—627，1981.
3. Doetsch, K. and Gadsden, R.H.: Determination of total urinary protein combining loery sensitive and Biuret specificity. *Clin. Chem.* 19, 1170—1178, 1973.
4. Doetsch, K.: Determination of total urinary protein by combined gel-filtration and automated biuret reaction, *Clin. Chem.* 18, 296—298, 1973.
5. 泉 武寛：尿微量蛋白定量法とその検体尿の保存法の検討、岡山医学会雑誌，94，453—462，463—470，1982.
6. 緒方正名：濾紙BPB染色法による疲労尿蛋白定量法に関する研究、岡山医学会雑誌，74，68—71，1962.
7. 緒方正名，松田 昭：尿微量蛋白の新定量法およびエネルギー代謝と尿蛋白排泄量との関係、労働化学，42，794—798，1966.
8. 乾 清茂，泊 博夫，中川裕史，野々村英二，中嶋克行：臨床検査における新しいタンパク質定量試薬—トネイン-TPについて—、臨床検査機器・試薬，3，372—376，1980.
9. 寺田由剛，新発田杏子，市橋治雄：抗体ゲル単純拡散法と抗原ゲル単純拡散法の進歩、臨床化学，2，28—

- 55, 1973.
10. 中野照一, 岩垣承恒, 原田邦彦, 酒井良介, 清水隆介, 酒井敏夫: 運動負加による尿中蛋白の出現とその分画について, 体力科学, 20, 200—209, 1971.
 11. Pootmans, J.R.: Influence of physical exercise on protein in biological fluids. *Biochem. Exercise Med. Sports.* 3, 312—327, 1969.
 12. 松井義典: Donaggio 反応及び尿微量蛋白定量法に関する研究 第1報 大学生の運動負荷後尿中の Donaggio 反応値, α -Acid-glicoprotein 濃度, Albumin 濃度の変動, 岡山医学会雑誌, 92, 981—988, 1980.

Studies on determination of urinary protein
Part II. The use of Coomassie Brilliant Blue G-250 for
protein measurement immediately after urine excretion

Yukiko TANAKA

Department of Public Health, Okayama University Medical School, Okayama Japan

(Director: Prof. M. Ogata)

The total protein in urine from young boys before and after exercise was measured by spectrophotometry, using the TONEIN-TP reagent, and at the same time by naked-eye colorimetry.

Both methods were performed without delay after the urine was excreted. The latter method is simpler than the usual methods. In order to confirm the reliability of the naked-eye colorimetry, total protein in the urine of factory workers was also determined.

The following results were obtained:

1. The total protein in the urine of young boys before and after exercise was measured immediately after excretion in the field using a portable spectrophotometer. The young boys between the ages of 15-17 trained and rested together at a lodge during the summer of 1981. They belong to a basket ball or judo team.

2. It was confirmed that the increase in urine albumine was greater after exercise than before by single radial immunodiffusion assay. The value of total protein and albumine in urine correlated well, especially in tests after exercise.

3. The author devised a simple method in which the TONEIN-TP reagent was added to the urine and coloration was determined with the naked eye instead of with a spectrophotometer. There was no statistical difference between the two methods.

4. The measurement of total protein in urine from workers was done by the TES-TAPE and the naked-eye methods. The latter method was more sensitive (5 mg/dl) than the TES-TAPE (30 mg/dl) method, so it is thought to be convenient when quick measurements are required. This method using the TONEIN-TP reagent was simple and sensitive. Moreover, the urine was used immediately after being excreted in the field, therefore, it was not necessary to worry about a chemical change occurring during preservation of the urine.